

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. F. P. Gall)

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR REGIONALEN HYPERTHERMIEN
PERFUSION UNTER DEM BESONDEREN
ASPEKT DER ZYTOSTATIKUMAPPLIKATION**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Jonas Göhl
aus Waldsassen

1981 № 435

Aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. F. P. Gall)

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR REGIONALEN HYPERTHERMIEN
PERFUSION UNTER DEM BESONDEREN
ASPEKT DER ZYTOSTATIKUMAPPLIKATION

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Jonas Göhl
aus Waldsassen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Tonak
Korreferent: Prof. Dr. F.P. Gall
Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.1981

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	Einleitung	1 - 2
II.	Allgemeiner Teil	3 - 11
A.	Hyperthermie und Chemotherapie	3 - 6
1.	Begriff	3
2.	Auswirkungen der Hyper- thermie	3 - 4
3.	Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie	5 - 6
B.	Die regionale hypertherme Zytostatikaperfusion	7 - 11
1.	Methodik	7 - 9
2.	Anwendung der regionalen hyper- thermen Zytostatikaperfusion	9 - 10
3.	Überlegungen zu einer tier- experimentellen Studie	10 - 11

III. Experimenteller Teil

12 - 67

A. Durchführung	12 - 41
1. Versuchsplanung	12 - 13
2. Versuchstiere	12 - 14
3. Versuchsaufbau	15 - 16
4. Zytostatikum und Lösungsmittel	17 - 20
5. Operationsablauf	21 - 38
a. Kanülierung der Extremität	21 - 24
b. Perfusion der Extremität	25 - 37
b1. Perfusionskreislauf	25 - 28
b2. Temperaturmessung	28
b3. Radioaktive Markierungs- methode zur intraoperativen Leckbestimmung	29 - 33
b4. Zytostatikumapplikation	34 - 36
b5. Spülung der perfundierten Extremität	36 - 37
c. Naht der Gefäße und Wundverschluß	38
6. Postoperative Versorgung der Versuchstiere	39
7. Quantitative Bestimmung der Zytostatikumkonzentration im Perfusionskreislauf	40 - 41

B. Ergebnisse	42 - 67
1. Allgemeine Ergebnisse	42 - 43
2. Ergebnisse in Bezug auf Lösungsmittel und Melphalanapplikation	44 - 65
a. Abhängigkeit der Melphalan-konzentration von der Zeit	45 - 46
b. Einfluß der Temperatur auf den Konzentrationsabfall von Melphalan	47 - 48
c. Einfluß der Leckgröße auf die Konzentrationsabnahme von Melphalan	49 - 50
d. Einfluß auf die Schwellung des perfundierten Gewebes bei Lösungsmittel- und Melphalaneinwirkung	51 - 53
e. Auswirkungen der Melphalanapplikation auf das pH und die Blutgaswerte (pO_2 , pCO_2 , SAT) im Perfusat	54 - 55
f. Auswirkungen der Melphalanapplikation auf das Hämoglobin in Perfusions- und Körperkreislauf	56 - 57

g.	Auswirkungen der Melphalanappli- kation auf den Kaliumspiegel in Perfusions- und Körperkreislauf	58 - 60
h.	Einfluß des Melphalans auf die Aktivität der Laktatdehydrogenase in Perfusions- und Körperkreislauf	61 - 62
3.	Statistische Methoden zur Ergebnissicherung	63 - 64
IV.	Diskussion	65 - 76
V.	Zusammenfassung	77 - 80
VI.	Literaturverzeichnis	81 - 88

I. EINLEITUNG

Die gezielte Krebsbekämpfung hat sich zu einem der dringlichsten Anliegen der modernen Medizin entwickelt. Die Vehemenz der Anstrengungen mag darin begründet liegen, daß im Jahre 1974 nach der amtlichen Todesursachenstatistik in der BRD von insgesamt 727511 Menschen 139983 an bösartigen Neubildungen verstorben sind, was einer Rate von ca. 20 % entspricht. (Eder - Gedigk 1977)

Nach K. H. Bauer (1963) liegt die Ursache dafür möglicherweise einmal in der besonders in der ersten Hälfte unseres Jahrhunderts stetig gestiegenen Lebenserwartung, zum anderen an den vor allem von der Industrie immer neu und vermehrt produzierten canzerogenen Noxen physikalischer und chemischer Art mit der Gefahr der erhöhten Exposition der Bevölkerung.

Nach Linder (1978) erreichen die Überlebensraten krebskranker Patienten heute eine Höhe von durchschnittlich 30 - 40 %.

Eine deutliche Steigerung dieser Quote ist durch die alleinige chirurgische Intervention bei dem

heutzutage auf diesem Sektor erreichten Stand wahrscheinlich nicht mehr möglich. So gilt es, außer dem Vortreiben und Ausbau der praeventiven Diagnostikmöglichkeiten mit der Ausschaltung eventueller Noxen, ein besonderes Augenmerk auf die adjuvante Strahlen- und Chemotherapie, wie auch auf die Entwicklung der Tumorimmunologie und nicht zuletzt der Hyperthermie zu richten.

II. ALLGEMEINER TEIL

A. Hyperthermie und Chemotherapie

1. Begriff

Als Hyperthermie bezeichnet man die Erhöhung der physiologischen Temperatur eines Gesamtorganismus oder einer bestimmten Region.

Nach Dietzel (1978) sind bei Warmblütern bei Temperaturen von 39°C bis 41°C die Bedingungen einer sogenannten milden Hyperthermie erreicht. Ab 42°C liegt eine Extremhyperthermie vor.

2. Auswirkungen der Hyperthermie

Zahlreiche Autoren (Giovanella et al. 1973, Ben Hur et al. 1978, G. M. Hahn 1978, Stehlin et al. 1975, Overgaard 1977, Crile 1962) konnten mit unterschiedlichsten Untersuchungen wiederholt die erhöhte Wärmeempfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber den jeweils ent-

sprechenden gesunden Geweben nachweisen. Die Temperaturen bei diesen Experimenten bewegten sich dabei zwischen 42°C und 43°C . Dickson et al. (1976) konnte jedoch auch zeigen, daß ab 43°C bei einem großen Prozentsatz gesunder Zellen ebenso irreversible Veränderungen auftraten. Somit bleibt festzuhalten, daß sich der therapeutische Anwendungsbereich der Hyperthermie von 41°C bis maximal 43°C erstreckt. Innerhalb dieser Temperaturspanne ist eine selektive und nachhaltige Schädigung von Tumorzellen gegeben. Der Mechanismus dafür ist in den Einzelheiten noch weitgehend unbekannt (Dickson 1977). Im Temperaturbereich der milden Hyperthermie (39°C bis 41°C) wurden sogar gesteigertes Tumorstadium und früher einsetzende Metastasierung beschrieben. Als Ursache dafür werden gesteigerte Stoffwechselvorgänge und die Selektierung unempfindlicher Tumorzellen angenommen (Dickson 1977).

3. Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie

Vor allem im Bereich der milden Hyperthermie, wo wie oben beschrieben die alleinige Wärmeapplikation sogar therapeutisch ungünstige Effekte mit sich bringen kann, zeigt sich die Kombination mit Zytostatika als besonders sinnvoll. Es kommt hierbei speziell bei Präparaten aus der alkylierenden Reihe zu einer Verstärkung ihrer Wirkung, die wohl darauf zurückzuführen ist, daß der bei milder Hyperthermie gesteigerte Zellstoffwechsel eine besonders schnelle und intensive Anreicherung der zytotoxischen Substanzen in den Tumorzellen ermöglicht. (Overgaard 1977, Westra et al. 1971, Hahn 1978). Nach Strom et al. (1977) mag der synergistische Effekt bei lipophilen Zytostatika darin liegen, daß durch die hier wahrscheinlich stattfindende Zellmembranschädigung von Tumorzellen eine erhöhte Wärmeempfindlichkeit erreicht wird.

Begleiter et al. (1979) beschreibt einen aktiven Transportmechanismus von Melphalan, einem N - Lost Derivat aus der alkylierenden Reihe gegen ein Konzentrationsgefälle. Dieses Melphalan (Alkeran^R) wird als Zytostatikum im später folgenden experimentellen Teil ausschließlich zur Anwendung kommen.

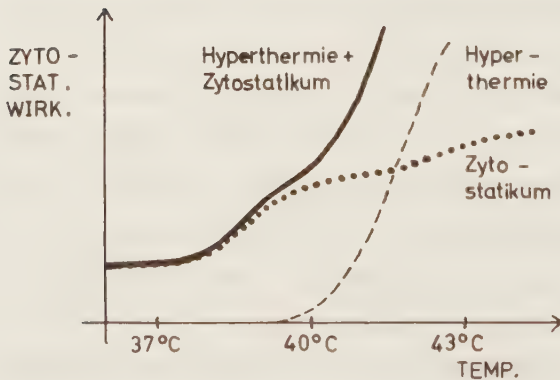


Abb. 1: Graphische Darstellung des synergistischen Effektes von Hyperthermie und Zytostatikumtherapie in Abhängigkeit von der Temperatur

B. Die regionale hypertherme Zytostatika-perfusion

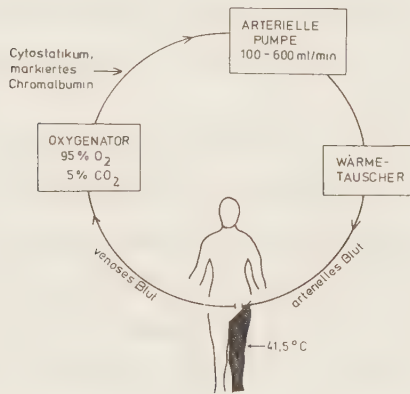
1. Methodik

Die Möglichkeiten einer Wärmeapplikation sind vielfältig. Sie reichen von einfachen Wasserbädern über die Ultraschall- bis zur Hochfrequenztherapie. Grundsätzlich ist zwischen Ganzkörperhyperthermie und lokaler bzw. regionaler Hyperthermie zu unterscheiden.

Bei der regionalen hyperthermen Perfusion, einer Variante der lokalen Hyperthermiebehandlung, auf welche im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich eingegangen werden soll, wird jeweils nur eine Körperregion und hier speziell eine Extremität einer Wärmebehandlung unterzogen. Eine zusätzliche Kombination mit einem Zytostatikum ist hier insofern günstig realisierbar, indem die zu therapierende Extremität vom Körperkreislauf getrennt wird und über einen extrakorporalen Kreislauf sowohl erwärmt, als auch mit zytostatischen Medikamenten versorgt werden kann.

Ein überzeugender Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß einmal eine um ein Vielfaches höhere Zytostatikumkonzentration anwendbar ist, da die besonders empfindlichen Organe des blutbildenden Systems und Immunsystems durch Ausschaltung des korporalen Kreislaufs umgangen werden können, zum anderen wird hiermit eine besonders homogene Durchwärmung der Gliedmaße über das arterielle Gefäßsystem auf physiologische Weise erreicht. Der Kollateralkreis wird nach Anschluß der großen Gefäße an den extrakorporalen Kreislauf mit einem um den Gliedmaßenansatz straff gewickelten Tourniquet unterbunden. Die Überwachung der Isolation der Extremität vom Körperkreislauf erfolgt mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen. Die Reaktion der Gefäßwand und des perivaskulären Gewebes stellt den limitierenden Faktor in der extremen Temperaturwahl und Medikamentenkonzentration dar.

Folgendes Schema soll zusammenfassend die Methode der regionalen hyperthermen Perfusion verdeutlichen.



SCHALTSCHEMA EINER EXTREMITÄTENPERFUSION

Abb. 2: Schematische Darstellung einer Perfusion

2. Anwendung der regionalen hyperthermen Perfusion

Die regionale hypertherme Perfusion kommt ausschließlich bei malignen Tumoren der Extremitäten zur Anwendung.

Neben der großzügigen lokalen Exzision des Tumors und anschließender Lymphknotendissektion wird die regionale hypertherme Zytostatikum-perfusion als ergänzende Maßnahme seit Dezember 1975 an der Universitätsklinik Erlangen zur Therapie von malignen Melanomen und Weichteilsarkomen eingesetzt.

Die Indikation zur Operation ist bei malignen Melanomen der high risk Gruppe mit und ohne regionalen Lymphknotenmetastasen gegeben.

High risk Melanome liegen vor, wenn das Mikrostadium des Tumors der Klasse 3, 4 oder 5 (nach Clark et al. 1969) entspricht, oder der vertikale Tumordurchmesser 0,76 mm überschreitet. (Tonak 1978)

3. Überlegungen zu einer tierexperimentellen Studie

Es hat sich jedoch auch gezeigt, daß die regionale hypertherme Zytostatikumperfusion eine Reihe von Komplikationen und Nebenwirkungen verfahrensspezifischer Natur mit sich bringt.

Im Vordergrund stehen dabei länger andauernde Schwellungszustände, Nervenlähmungen und ausgedehnte Gewebsnekrosen, welche in besonders schweren Fällen eine Amputation der perfundierten Extremität zur Folge hatten, oder für den Patienten sogar letale Auswirkungen mit sich brachten.

Dieses gab dazu Anlaß, in einer tierexperimentellen Studie die Einwirkungen von Temperatur, Lösungsmittel des Zytostatikums (= Propylenglykol) und Zytostatikum auf gesundes Gewebe unter den Bedingungen der hyperthermen Perfusion genauer zu untersuchen, zumal bis heute in der Literatur diese Thematik nur in Teilaspekten abgehandelt wurde.

So konstruierten wir ein Versuchsmodell, welches unter möglichst gleichbleibenden Bedingungen gestattete, Untersuchungen über die Auswirkungen der Perfusion mit der differenzierten Betrachtung der Parameter Temperatur, Lösungsmittel und Zytostatikum anzustellen. Auf diese Weise sollten auch Aussagen über mögliche gegenseitige Beeinflussung und Zusammenhänge dieser drei Komponenten gemacht werden können.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Durchführung

1. Versuchsplanung

Der differenzierten Betrachtungsweise von Temperatur, Lösungsmittel- und Zytostatikum-einflüssen mußte bei der Planung der Versuche Rechnung getragen werden.

Die Durchführung der Experimente erfolgte in 3 Versuchsreihen zu je 15 Tieren. Jede Reihe wurde nochmals in 3 Temperaturgruppen zu je 5 Tieren unterteilt.

Die Tabelle auf Seite 13 gibt im Überblick die Versuchseinteilung wieder.

2. Versuchstiere

Bei der Auswahl der Versuchstiere wurde von der

Gewebetemperatur der Extremität während der Perf.	V e r s u c h s r e i h e			Zahl der Hunde je Gruppe
	I ohne Zusatz im Perfusions- kreislauf	II unter Zugabe des Lösungsmittels von Melphalan (Konz. 0,2 ml/kg Körpergewicht)	III unter Zugabe von Melphalan (2 mg / kg Körpergewicht)	
T E M P E R A T U R	37 ° C n = 5	37 ° C n = 5	37 ° C n = 5	n = 15
normo- therm				
hyper- therm	40 ° C n = 5	40 ° C n = 5	40 ° C n = 5	n = 15
extrem hypertherm	43 ° C n = 5	43 ° C n = 5	43 ° C n = 5	n = 15
Zahl der Hunde je Versuchsreihe	n = 15	n = 15	n = 15	n = 45

Tabelle 1: Versuchsplan über 45 Perfusionen

Überlegung ausgegangen, möglichst ähnliche Perfusionsbedingungen wie beim Menschen zu erreichen, um eine besonders hohe Übertragbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Ausschlaggebend dafür war die Größe der für die Perfusion vorgesehenen Extremität bzw. deren Blutvolumen.

Aus obigen und mehreren versuchstechnischen Gründen kamen deshalb nur große Bastard-Schäferhunde für die Experimente in Frage. Ihr Alter betrug ca. 2 bis 3 1/4 Jahre, das Gewicht schwankte zwischen 26 kg und 34 kg.

Die Untersuchung der Auswirkungen der Perfusion auf gesundes Gewebe machte das Arbeiten mit einem Experimentaltumor überflüssig. Zur Perfusion wurde jeweils der rechte Hinterlauf des Tieres herangezogen.

3. Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Versuche stand der Operationssaal der tierexperimentellen Abteilung der Chirurgischen Klinik zur Verfügung.

Dabei kamen folgende Apparaturen zum Einsatz:

Als Beatmungsgerät während der Intubationsnarkose diente ein Assistorgerät (Assistor 640) der Firma Dräger.

Die Perfusion der Extremität erfolgte mittels einer Herz-Lungen-Maschine. Über einen arteriellen und venösen Schlauch stand die Extremität mit der Maschine in Verbindung. Die Arteria femoralis superficialis wurde dabei mit einem Plastik-katheter der Größe Charrière Nr. 12 kanüliert.

Bei Anschluß der Vena femoralis konnte die Größe Charrière Nr. 16 des gleichen Fabrikats die Anforderungen erfüllen.

Die Herz-Lungen-Maschine setzte sich hauptsächlich aus 3 Komponenten zusammen; einem Membranoxygenator der Firma Bentley Laboratories vom Typ Q 130, einem Wärmetauscher zur Erwärmung

des Perfusats auf die jeweils gewünschte Temperatur und einer Rollerpumpe (kleines Erlanger Modell), welche die konstante Perfusionsgeschwindigkeit von 300 ml pro Minute gewährleistete.

Als Temperaturmeßgerät fand ein Fabrikat der Firma Doric Scientific N. J. USA (Modell 406 Trenticator Typ 400 T / C) Verwendung.

Über 2 in das Subcutangewebe von Ober- und Unterschenkel der perfundierten Gliedmaße eingestochene Meßsonden (Thermocuple microprobe Typ IT - 18, Bailey Instruments Inc. N. J. USA) wurde die Gewebetemperatur kontinuierlich während der gesamten Operationsdauer registriert. Zur Kontrolle der Isolation des Perfusionskreislaufs vom Körperkreislauf diente nach Zugabe von radioaktiv markiertem Chromalbumin (^{51}Cr -Humanalbumin) in das Perfusat ein Isotopenflußmeßgerät vom Typ Nukleopan 2 K der Firma Siemens. Auf die Methodik der Leckbestimmung wird zu einem späteren Zeitpunkt näher eingegangen.

4. Zytostatikum und Lösungsmittel

Bei unseren Experimenten kam ausschließlich Melphalan (Alkeran ^R) zur Anwendung.

Es handelt sich hierbei um einen N - Lost Abkömmling aus der Gruppe der alkylierenden Zytostatika (= Radiomimetika).

Außer bei der hyperthermen Perfusion von malignen Melanomen wird es heute noch wirksam eingesetzt beim Ovarialkarzinom, Osteosarkom, multiplen Myelom, generalisierten Testisseminom, Mammacarcinom, bei der Polycythaemia vera, Lymphogranulomatose und chronisch myeloischen- und lymphatischen Leukämie.

Das Molekulargewicht von Melphalan beträgt 264. 1953 wurde es erstmals synthetisiert und in die klinische Therapie eingeführt.

Melphalan verändert die Struktur und damit den Informationsgehalt der DNA durch Übertragung und Bindung von labilen Alkylresten an die Stickstoffpositionen des Guanins. Durch diese Analgerung wird einmal eine Abänderung der

Basensequenz erreicht, zum anderen ist eine Hemmung der DNA - Reduplikation aufgrund der zwischen den Doppelsträngen der Helix möglichen Brückenbindungen von alkylierten N - Gruppen zweier benachbarter Guaninmoleküle gegeben. Zusätzlich wird eine Konformitätsänderung des Desoxyribonukleinsäurekomplexes ausgelöst. Darüber hinaus beeinflussen alkylierende Substanzen auch die RNA- und Proteinsynthese. Die Glykolyse wird über eine Einwirkung auf das Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) behindert. Die Alkylantienwirkung erstreckt sich auf den gesamten Generationszyklus der Zelle, wobei die Beeinflussung der Mitose nur gering ist. Es liegt somit keine Phasenspezifität vor. Die Wege der Metabolisierung von Mephalan sind nur wenig bekannt. Die Plasmahalbwertszeit wird mit 30 Min. bis 60 Min. angegeben. Bei erhöhten Temperaturen findet eine Inaktivierung über den Mechanismus der nicht-enzymatischen Hydrolyse statt. Ebenso ist ein temperaturabhängiger aktiver Transport in die Zelle gegen einen Konzentrationsgradienten möglich.

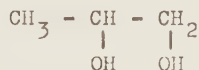
Nach Tattersall (1979) werden nach oraler Applikation 35 - 60 % des Stoffes während der ersten 24 Stunden über die Nieren ausgeschieden. Nach intravenöser Gabe setzt die Metabolisierung nur zögernd ein.

Das bei unseren Versuchen angewandte Melphalan liegt in Pulverform (zu 100 mg) vor. Um es für die Zugabe in den Perfusionakreislauf injektionsfertig zu machen, muß das Pulver zunächst in 1 ml einer äthanolischen 2 % igen Chlorwasserstofflösung gelöst und dann mit einem Gemisch aus Propylenglykol und Aqua dest. auf 10 ml verdünnt werden. In dieser 10 ml Zytostatikumlösung, die 100 mg Melphalan entsprechen, sind 5,4 ml Propylenglykol enthalten.

Es handelt sich hierbei um eine klare, farb- und geruchlose visköse Flüssigkeit mit der Dichte 1,04.

Strukturformel von Propylenglykol

(= Propandiol 1, 2):



Propylenglykol ist mit Wasser und Alkohol mischbar. Der Siedepunkt liegt bei + 188 ° C. Der Stoff besitzt eine ausgeprägte bakterizide Potenz.

In der 2. Versuchsreihe sollen die bei höheren Konzentrationen von Propylenglykol beschriebenen schädigenden Auswirkungen auf das Gewebe näher untersucht werden.

Die Dosierung des Lösungsmittels wurde dabei auf 0,2 ml / kg Körpergewicht festgelegt. Die Zugabe in den extrakorporalen Kreislauf erfolgte in einer Portion zu Beginn der Perfusion.

Das in der 3. Versuchsreihe applizierte Melphalan kam in einer Dosierung von 2 mg / kg Körpergewicht zur Anwendung. Das entspricht 0,2 ml / kg Körpergewicht der fertigen Lösung.

5. Operationsablauf

a. Kanülierung der Extremität

Die Operation wurde in Intubationsnarkose mit Trapanal^R und Lystenon^R durchgeführt. Zur maschinellen Beatmung diente ein Assistorgerät. Ein peripherer venöser Zugang ermöglichte die Aufrechterhaltung der Narkose und die Zufuhr einer Elektrolytlösung (500 ml Tutofusin OPS von Pfrimmer).

Nach Lagerung des Hundes auf den Rücken und Rasur des rechten Hinterlaufes erfolgte eine ausgiebige Hautdesinfektion von Extremität und Leistenregion mit Kodan.

Abbildung 3 auf Seite 22 zeigt die Lagerung und Beatmung des Versuchstieres.

Die rechte Leiste wurde mit einem längs verlaufenden ca. 10 - 12 cm vom Leistenband nach distal reichenden Hautschnitt eröffnet und nach Durchtrennung des subcutanen Bindegewebes die

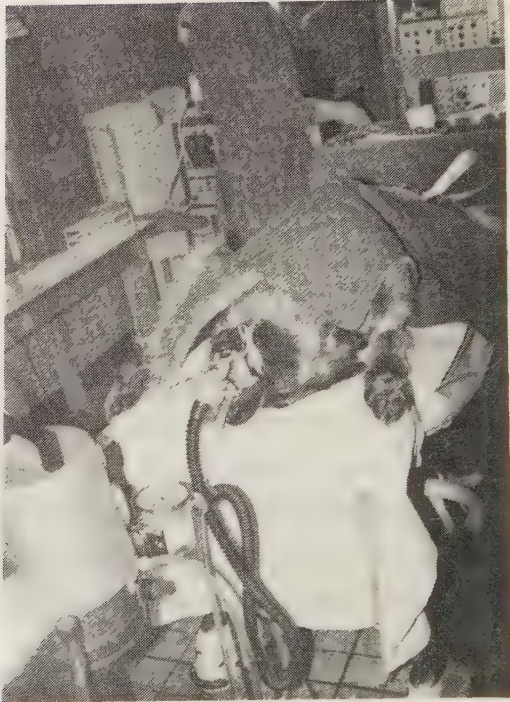


Abb. 3: Das narkotisierte Versuchstier ist auf den Rücken gelagert und wird maschinell beatmet.

Arteria femoralis superficialis und die Vena femoralis freipräpariert. Ebenso erfolgte eine Darstellung der zu- bzw. abführenden Gefäßäste innerhalb des einzusehenden Operationsfeldes.

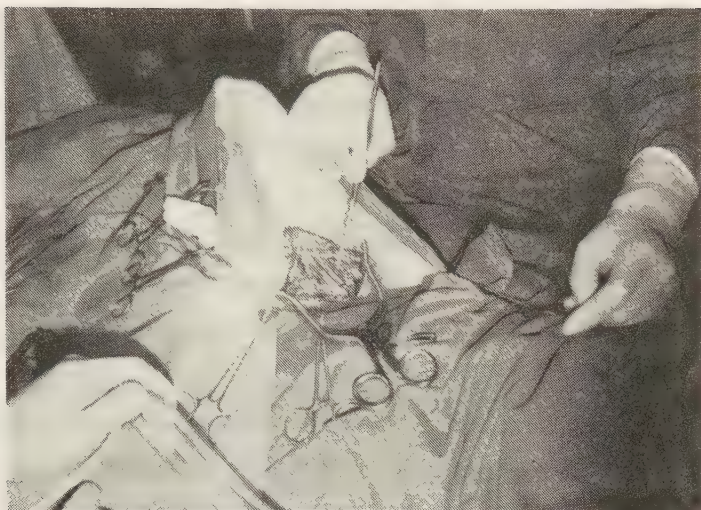


Abb. 4: Darstellung der rechten Leistenbeugen-
gefäße

Durch die temporäre Ligatur dieser Seitenäste konnte eine möglichst hohe Isolation des Perfusionskreislaufes vom Körperkreislauf erreicht werden.

Nach Abklemmung der beiden Hauptgefäße mit Alligatoren erfolgte zunächst die Kanülierung der in Längsrichtung inzidierten Vena femoralis mit einem Plastikkatheter der Größe Charrière Nr. 16.

Die Kanülierung der in der Regel quer eröffneten Arteria femoralis superficialis wurde in gleicher Höhe mittels eines ebenfalls nach distal eingeführten Katheters der Größe Charrière Nr. 12 durchgeführt.

Zur Abdichtung der Kanülierungsstellen diente ein über einen Gummisteg geführtes, fest angezogenes Merselenebändchen.

Vor Anschluß der beiden Katheter an den entsprechenden arteriellen und venösen Verbindungsschlauch zur Herz-Lungen-Maschine mußte eine Esmarch Binde als Tourniquet zur Unterbindung des oberflächlichen Kollateralkreislaufes straff um den Gliedmaßenansatz geschlungen und unter Spannung fixiert werden.



Abb. 5: Anlegen des Tourniquets

b. Perfusion der Extremität

b 1. Perfusionskreislauf

Zur Füllung der Herz-Lungen-Maschine dienten 800 ml 5 % ige Glukoselösung. Es lagen somit nach Mischung der Glukose mit dem Blut der perfundierten Extremität die Bedingungen einer erwünschten Hämodilution vor.

Bei unseren Experimenten war der extrakorporale Kreislauf wie folgt aufgebaut und ausgestattet:

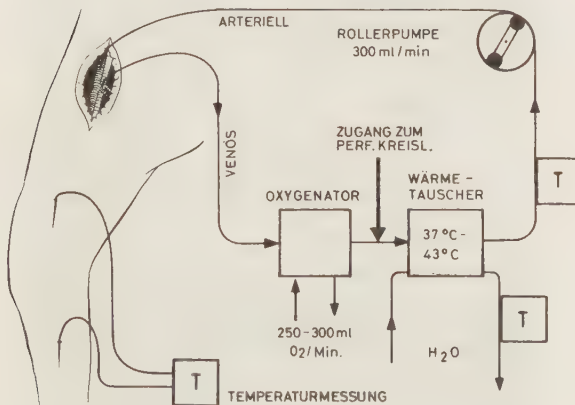


Abb. 6: Aufbau des extrakorporalen Kreislaufes bei einer hyperthermen Zytostatikun-perfusion (schematisch)

Die Perfusionsdauer betrug 60 Minuten.

Die mittlere Durchflußgeschwindigkeit legte man bei allen Versuchen auf 300 ml pro Minute fest.

Die Gerinnung im Perfusionskreislauf wurde durch Zugabe von durchschnittlich 6000 i. E. Heparin aufgehoben.

Der O_2 - flow im Oxygenator schwankte zwischen 250 und 300 ml / Minute.

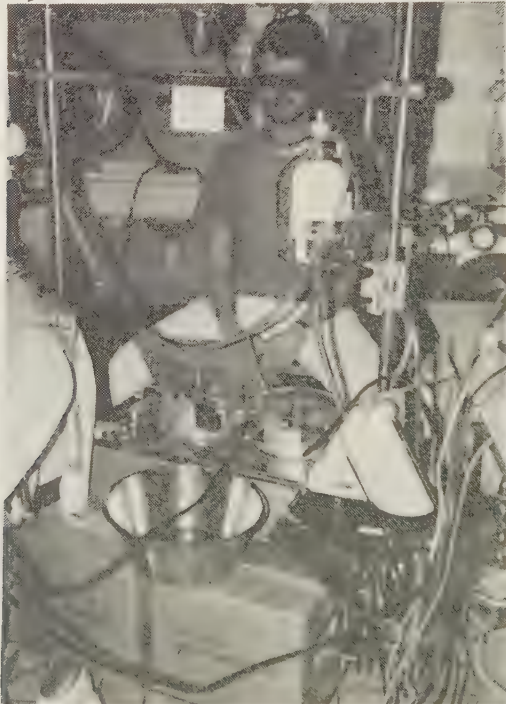
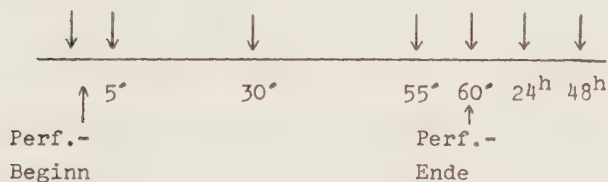


Abb. 7: Die verwendete Herz-Lungen-Maschine
während einer Perfusion

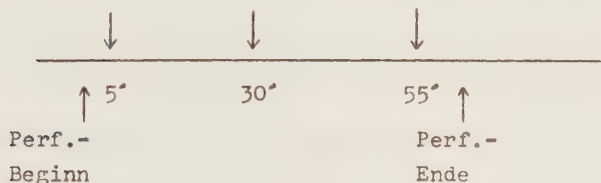
Ein Zugang zum Reservoir des Oxygenators ermöglichte während der Perfusion sowohl die Entnahme von Proben für die Blutgasanalysen, das Blutlabor und die Zytostatikumkonzentrationsbestimmung, als auch die Zugabe von radioaktiv markiertem Chromalbumin und des Zytostatikums.

Folgende Skizze verdeutlicht die Zeiteinteilung bei der Entnahme von Blutgasanalysen- und Blutlaborproben aus Körper- und HLM - Kreislauf:

Blutentnahme aus dem Körperkreislauf



Blutentnahme aus dem Perfusionskreislauf



Zur Bestimmung kamen:

pH, pO_2 , pCO_2 , BE, SAT, Erythrozytenzahl, Hb, Hb i.S., LDH, HBDH und K^+ .

b 2. Temperaturmessung

Die Temperatur des Perfusats im arteriellen Schenkel konnte über die Wasserzufuhr zum Wärmetauscher genau reguliert werden.

Die Gewebetemperatur der perfundierten Gliedmaße wurde über 2 in das subkutane Gewebe von Ober- und Unterschenkel eingestochene Meßsonden einem elektronischen Meßgerät zugeführt. Die nahezu trägheitslose digitale Anzeige ermöglichte eine exakte kontinuierliche Messung über die gesamte Perfusionsdauer.

Zur weiteren Kontrolle der Temperaturverhältnisse im extrakorporalen Kreislauf registrierten wir noch die Temperatur im zuführenden arteriellen Schenkel, sowie an der Ausstrombahn des Heizwasserkreislaufes vom Wärmetauscher.

b 3. Radioaktive Markierungsmethode zur
intraoperativen Leckbestimmung

Einen der wichtigsten Faktoren bei der regionalen hyperthermen Zytostatikumperfusion stellt die Isolierung der perfundierten Extremität vom Körperkreislauf dar. Somit erscheint es besonders wichtig, eine genaue Methode für die Kontrolle dieser Abriegelung zu besitzen.

Eine von Stehlin (1961) und Schraffordt Koops (1972) angegebene und modifiziert zur Anwendung gebrachte Methode erlaubte eine kontinuierliche Bestimmung des Lecks während der Operation mit Hilfe von radioaktiv markiertem Chromalbumin.

Dazu wurden kurz nach Beginn der Perfusion $5 \mu\text{Ci}$ dieses ^{51}Cr - Humanalbumins in den Körperkreislauf injiziert. Ein Isotopenflußmeßgerät, dessen Meßkopf über dem Herzen des Versuchstieres justiert war, registrierte die ausgelösten Impulse pro Minute (= N_{10}). Die nun erfolgte Zugabe von $45 \mu\text{Ci}$ in den Perfusionskreislauf ermöglichte eine Aussage

über die Isolation der perfundierten Extremität vom Körper durch die weitere Messung der Impulszahl pro Minute über dem Herzen (= N_{100}).

Je nach Größe des Lecks stiegen die gemessenen Werte pro Minute über den Ausgangswert von N_{10} an.

Folgende Aufgliederung und Überlegung gestattet eine genaue quantitative Aussage über das jeweilige Leck:

N_0 = Background (natürliche Radioaktivität, kosmische und atmosphärische Strahlung; wird vor Injektion von ^{51}Cr - Humanalbumin gemessen)

N_{10} = nach Injektion von 5 μCi ^{51}Cr - Humanalbumin in den Körperkreislauf gemessene Impulszahl / Min. (Messung ist erst einige Minuten nach Zugabe durch gleichmäßige Verteilung konstant)

N_{100} = nach Injektion von 45 μCi ^{51}Cr - Humanalbumin in den Perfusionskreislauf gemessene Impulszahl / Minute

Berechnung des Lecks:

Unter der Annahme von 100 % Leck gilt:

$$N_{100} = N_{10} + 10 (N_{10} - N_0) \cdot x$$

$$x = \frac{\text{Volumen im Körperkreislauf}}{\text{Vol. im Körperkreislauf} + \text{Vol. im Perfusionskreislauf}}$$

Die Berechnung des tatsächlichen Lecks erfolgt durch Gegenüberstellung des obig theoretisch berechneten N_{100} und des tatsächlich während der Perfusion gemessenen Wertes.

Dabei gilt:

$$\text{Leck} = \frac{\text{gemessenes } N_{100} - N_{10}}{\text{für 100 \% berechnetes } N_{100} - N_{10}} \times 100$$

(in %)

Die Berechnung des Gesamtvolumens erfolgte aus dem Körpergewicht nach der Formel
70 ml x kg Körpergewicht.

Das Volumen der perfundierten Extremität wurde nach der Neunerregel auf 18 % des Gesamtblutvolumens geschätzt.

Somit ergab sich für die Berechnungen:

Volumen des Körperkreislaufes (während der
Perfusion) =

Volumen des Gesamtkörperkreislaufes - 18 %

Volumen des Perfusionskreislaufes =

Volumen der Extremität + Volumen in der HLM
(18 % d. Ges.blutvol.) (800 ml)

Während der Perfusion wurde die Leckbestimmung
in 5 - minütigen Abständen durchgeführt.

Eine exakte kontinuierliche Beurteilung der
Vermischung der beiden Kreisläufe war somit
gegeben, und eine indirekte Aussage über die
Abwanderung des Zytostatikums in den Körper-
kreislauf möglich.



Abb. 8: Das verwendete Isotopenflußmeßgerät
bei der Registrierung der radio-
aktiven Impulse während der Perfusion

b 4. Zytostatikumapplikation

Die Zugabe von Melphalan in einer Dosierung von 2 mg / kg Körpergewicht in den Perfusionskreislauf erfolgte nach der ersten Leckbestimmung. Um eine gleichmäßige Verteilung im Perfusat zu erreichen und hohe Anfangskonzentrationen im arteriellen Gefäßbett zu vermeiden, wurde eine Portionierung der berechneten Gesamtdosis in 3 gleiche Teile vorgenommen und in ca. 5 - minütigen Abständen zugegeben.

Die Einteilung der Probenentnahmen aus dem Perfusat für die Konzentrationsbestimmungen des Zytostatikums mußte demnach geringfügig modifiziert werden.

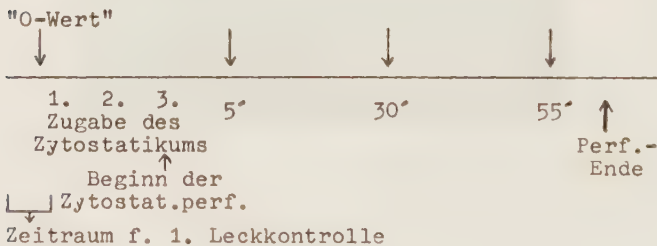


Abb. 9: Zeitpunkte der Blutentnahmen für die quantitative Bestimmung des Zytostatikums aus dem Perfusionskreislauf

Als Zeitpunkt des Beginns der Zytostatikum-perfusion wurde die Zugabe der 3. Melphalan-portion angesehen, da anzunehmen ist, daß durch die erst langsam stattfindende Verteilung im Oxygenatorreservoir vorher keine therapeutisch wirksame Zytostatikumkonzentration im zuführenden arteriellen Schenkel vorliegt.

Die Abnahme der ersten Probe aus dem Perfusions-kreislauf für die Konzentrationsbestimmung des Zytostatikums erfolgte 5 Minuten nach Zugabe der 3. Melphalanportion. Weitere Proben wurden nach 30 und 55 Minuten entnommen. Außerdem machte die Zytostatikumbestimmung aus verfahrenstechnischen Gründen die Entnahme einer Perfusatprobe vor Melphalangabe (= " 0 - Wert ") notwendig.

Wieberdink (1979) beschreibt eine kontinuierliche Zufuhr des Zytostatikums zur idealen Verteilung im Perfusionskreislauf.

Den Zeitraum für die Zugabe berechnet er nach der Formel:

$$T_I = \frac{V}{F}$$

T_I = Zeit in Minuten, während der das
Zytostatikum mit konstanter Geschwin-
digkeit in den Perfusionskreislauf
gegeben wird.

V = Perfusionsvolumen =
Blutvolumen der Extremität + Vol. i. d. HLM

F = mittlere Durchflußgeschwindigkeit des
Perfusats

Dieses Verfahren konnte bei unseren Versuchen
wegen der bereits begonnenen letzten Unter-
suchungsreihe und der damit verbundenen Abänderun-
gen der Versuchsbedingungen nicht mehr zur
Anwendung kommen.

b 5. Spülung der perfundierten Extremität

Nach Ablauf der 60 - minütigen Perfusion wurde
eine Spülung der Gliedmaße vorgenommen.

Es hat sich gezeigt, daß der Wahl der Spülflüssigkeit eine entscheidende Bedeutung zukommt. So kam nach anfänglichem Einsatz von Ringerlösung nur noch 5 % iges Humanalbumin zur Verwendung. Nebenwirkungen wie Rötung und Schwellung der Extremität traten bei Spülung mit dieser Plasmaproteinlösung nicht mehr in solch starkem Ausmaß auf.

Das Volumen der Spülflüssigkeit betrug zwischen 1,5 l und 2,0 l.

Gegen Ende des Spülvorganges war eine deutliche Aufhellung der Flüssigkeitssäule im venösen Verbindungsschlauch als Zeichen der nahezu vollständigen Auswaschung von Erythrozyten bzw. deren Fragmenten aus der Extremität erkennbar.

Der damit unvermeidliche Blutverlust wurde durch Transfusion von 400 ml Frischblut gegen Ende der Operation vollständig wieder ausgeglichen. Untersuchungen von Erythrozytenzahl und Hämoglobin im Gesamtkörperkreislauf am 1. und 2. postoperativen Tag haben dieses bestätigt.

c. Naht der Gefäße und Wundverschluß

Nach Beendigung des Spülvorganges wurden die Plastikkatheter aus den großen Gefäßen entfernt und die Inzisionsstellen mit einer subtilen Nahttechnik geschlossen. Der Gefäßverschluß erfolgte fortlaufend mit feinstem Nahtmaterial (6 x 0 BV 1 Ethicon) in Richtung der Inzision. Mit Abnahme der proximal angelegten Alligatoren und Lösung der temporären Ligaturen waren die ursprünglich herrschenden physiologischen Strömungsverhältnisse wiederhergestellt. Nach Entnahme von Arterien-, Venen-, Nerven-Muskel- und Hautproben für Untersuchungen am Pathologischen Institut der Universität, wurde, um Nachblutungen zu vermeiden, der Musculus sartorius über die freiliegende Arterie und Vene gezogen. Daraufhin erfolgte schichtweiser Wundverschluß mit einer fortlaufenden Hautnaht. Zur Sicherung des Wundverschlusses interponierten wir Einzelknopfnähte. Das Auftragen eines Sprühverbandes brachte eine Verbesserung der Wundheilung.

6. Postoperative Versorgung der Versuchstiere

Die antibiotische Abdeckung der Versuchstiere wurde postoperativ mit täglich einer Ampulle Chloramphenicol i. m. (1 x 1 g Paraxin^R) durchgeführt. In der Regel standen die Hunde am 1. - 2. postoperativen Tag von selbst auf. Sie erhielten normales Hundefutter.

Am 5. postoperativen Tag entnahmen wir weitere Proben für pathologische Untersuchungen.

Bei den Tieren der letzten Versuchsreihe erfolgte noch eine vergleichende Bestimmung der Nervenleitungsgeschwindigkeit am Nervus ischiaticus der perfundierten und gesunden Extremität.

Anschließend wurden alle Tiere getötet.

7. Quantitative Bestimmung der Zytostatikum- konzentration im Perfusionskreislauf

Die zu den 3 Zeitpunkten aus dem Perfusat entnommenen Proben wurden sofort auf Eiswassertemperatur abgekühlt und postoperativ im Stoffwechsellabor der Chir. Universitätsklinik unter der Leitung von Prof. P. O. Schwille verarbeitet.

Für die Konzentrationsbestimmung kam die von Klatt et al. (1960) beschriebene calorimetrische Nachweismethode zur Anwendung.

Bei Eiswassertemperatur ist für mindestens 3 Stunden keine Farbaktivitätsveränderung der Probe zu befürchten.

Als Reagenzien werden benötigt: Nitrobenzpyridin, 5 % ige Essigsäure und Triäthylamin.

Zur Bestimmung gibt man zu 1 ml Plasma aus der Probe 0,1 ml Essigsäure, 2,9 ml Aqua dest. und 0,5 ml Nitrobenzpyridin. Das Gemisch wird nach vorsichtigem Schütteln für 15 Minuten in ein 80 ° C heißes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung

im Eisbad und anschließender Zentrifugierung werden 2 ml des Überstandes in eine Küvette abpipettiert. Nach Zugabe von 2 ml Triäthylamin erfolgt die Messung der Absorption bei 565 Nanometer.

Die Farbkomplexreaktion hat ihr Optimum bei pH 4,5 - 5,0 , was die obige Zugabe von 5 % iger Essigsäure unerläßlich macht.

Der Reaktionsmechanismus besteht darin, daß Melphalan in saurem Milieu mit Nitrobenzpyridin und Triäthylamin einen blau-violetten Komplex bildet, der bei 565 nm calorimetrisch bestimmt werden kann.

Zur quantitativen Bestimmung ist zudem die Erstellung einer Eichkurve durch Ansetzen von bekannten Konzentrationen mit Messung der jeweiligen Absorptionswerte erforderlich.

Bei der im Labor erstellten Eichkurve ergaben die Extinktionen bei Melphalankonzentrationen zwischen 0,03 $\mu\text{Mol} / \text{ml}$ und 0,378 $\mu\text{Mol} / \text{ml}$ eine Gerade.

B. ERGEBNISSE

1. Allgemeine Ergebnisse

Der Eingriff dauerte durchschnittlich 3 bis 4 Stunden.

Insgesamt wurden 66 Hunde operiert. Davon überlebten 45 die geforderten 5 Tage nach der Operation und standen damit für alle geplanten Untersuchungen zur Verfügung.

Vorwiegend zu Beginn unserer tierexperimentellen Studie erlag der Hauptteil der ad exitum gekommenen Hunde den oft massiven Nachblutungen meist aufgrund von Gefäßwandnekrosen oder Nahtinsuffizienzen der kanülierten Gefäße.

Eine Modifikation von Gefäßinzision und -naht, sowie die Bedeckung der Kanülierungsstellen mit dem von lateral über das Gefäßbett gezogenen Musculus sartorius, brachte den gewünschten Erfolg.

Als weitere Hauptursache wurde ein Nierenversagen auf dem Boden einer Crushniere beobachtet.

Es hatte bei diesen Tieren keine Spülung der Extremität mit Ringer- oder Plasmaproteinlösung stattgefunden.

Zur Vermeidung dieser Komplikation setzte man daraufhin zunächst Ringer-Lösung als Spülmittel ein.

Eine Reduzierung der dabei beobachteten vermehrten Weichteilschwellung konnte nur durch die Anwendung von Plasmaproteinlösung erreicht werden.

2. Ergebnisse in Bezug auf Lösungsmittel- und Melphalanapplikation

Tabellarische Übersicht über die gemessenen Melphalankonzentrationen im Perfusat der 3. Versuchsreihe

Melphalankonz. i. mg / ml						
Temp. i. °C	Hund Nr.	nach			Leck in %	Melph.dosis i. mg
		5 Min.	30 Min.	55 Min.		
37	52	0,0345	0,0270	0,0190	0	67
37	53	0,0500	0,0332	0,0244	0	74
37	54	0,0445	0,0250	0,0162	1	40
37	55	0,0348	0,0160	0,0125	1	74
40	56	0,0300	0,0233	0,0180	0	72
40	57	0,0308	0,0213	0,0075	6	65
40	58	0,0490	0,0330	0,0111	5	61
40	59	0,0401	0,0141	0,0092	1	59
40	60	0,0245	0,0164	0,0180	2	51
43	61	0,0324	0,0198	0,0075	2	58
43	62	0,0348	0,0133	0,0051	5	56
43	63	0,0375	0,0266	0,0175	4	59
43	64	0,0575	0,0135	0,0095	5	43
43	65	0,0417	0,0331	0,0224	0	70
43	66	0,0536	0,0202	0,0105	1	49
n = 15		5 Min.	30 Min.	55 Min.		
Mittelwert:						
$\bar{x}$	=	0,0397	0,0224	0,0139		60
Standardabweichung:						
s	=	0,0095	0,0071	0,0059		

a. Abhängigkeit der Melphalankonzentration
von der Zeit

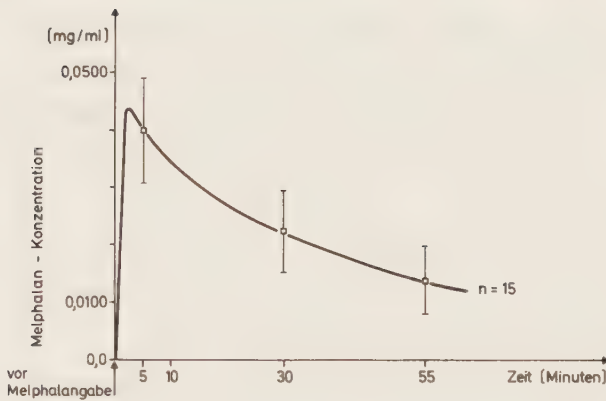


Abb. 10: Graphische Darstellung der Melphalan-
konzentrationen im Perfusionskreislauf
bei allen Temperaturen in Abhängigkeit
von der Zeit
(Bestimmung nach Gesamtgabe des
Melphalans bei 5 Min., 30 Min. und
55 Minuten)

Nach 5 Minuten konnten durchschnittlich 0,0397 mg Melphalan pro ml Perfusat nachgewiesen werden.

Bei einer mittleren Zugabe von 60 mg Melphalan in den extrakorporalen Kreislauf, dessen Gesamtvolumen (HLM - Volumen 800 ml + intravasales Beinvolumen eines 30 kg Hundes ca. 370 ml) mit etwa 1170 ml angenommen werden muß, wäre theoretisch eine Anfangskonzentration von ca. 0,0500 mg / ml zu erwarten.

Damit bleibt festzuhalten, daß bereits nach 5 Minuten 20 % des Melphalans aus dem Perfusionskreislauf verschwunden waren.

Anhand des Kurvenverlaufes ist erkennbar, daß die Melphalankonzentration während der Perfusion stetig abfiel. Die Halbwertszeit lag bei 30 Minuten.

Nach 55 Minuten waren noch durchschnittlich 0,0139 mg / ml nachweisbar. Dieser Wert entspricht einer weiteren Konzentrationsabnahme von Melphalan während der Perfusion um circa 66 % des 5 - Minuten - Wertes.

b. Einfluß der Temperatur auf den Konzentrations-
abfall von Melphalan

Hierzu ist eine Aufgliederung der Meßwerte in
die einzelnen Temperaturgruppen nötig.

Eine vergleichende Auflistung der entsprechenden
Mittelwerte zeigt folgende Tabelle:

Temp.	mittlere Melphalankonz. in mg / ml nach		
	5 Min.	30 Min.	55 Min.
37 ° C	$\bar{x} = 0,0410$	$\bar{x} = 0,0253$	$\bar{x} = 0,0180$
n = 4	s = 0,0076	s = 0,0071	s = 0,0050
40 ° C	$\bar{x} = 0,0349$	$\bar{x} = 0,0216$	$\bar{x} = 0,0128$
n = 5	s = 0,0097	s = 0,0074	s = 0,0049
43 ° C	$\bar{x} = 0,0429$	$\bar{x} = 0,0211$	$\bar{x} = 0,0121$
n = 6	s = 0,0103	s = 0,0077	s = 0,0066

Tabelle 3: Durchschnittliche Melphalankonzentrationen
im Perfusat nach 5 Min., 30 Min., 55 Min.
bei 37 ° C, 40 ° C und 43 ° C

Der Einfluß der Temperatur auf den Abbau des Melphalans wird aus dem Vergleich der Mittelwerte ersichtlich. Jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant verschieden.

Die Temperatur hatte somit keine besonderen Auswirkungen auf die Abnahme des Melphalans im Perfusionskreislauf.

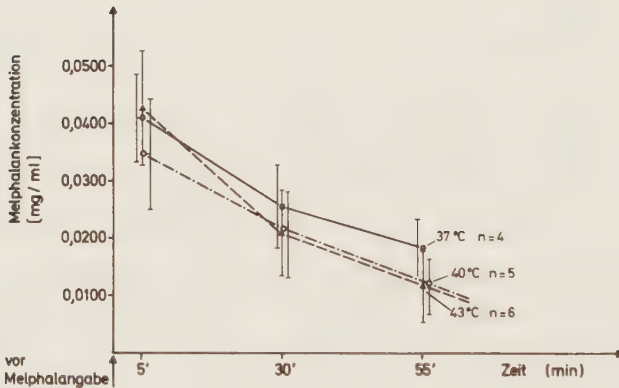


Abb. 11: Graphische Darstellung der Melphalan-konzentration im Perfusat bei verschiedenen Temperaturen (37, 40, 43 ° C) in Abhängigkeit von der Zeit

c. Einfluß der Leckgröße auf die Konzentrationsabnahme von Melphalan

Ein Leck mit einem Ausmaß von mehr als 6 % trat bei keinem Hund aus der letzten Versuchsreihe auf.

Bei Unterteilung der Melphalankonzentrationen von Tabelle S. 44 in eine Gruppe mit einer Leckgröße von 0 - 1 % (n = 7) und eine Gruppe mit einer Leckgröße von 2 - 6 % (n = 8) erhielten wir folgende Werte:

Leck	mittlere Melphalankonz. in mg / ml nach		
	5 Min.	30 Min.	55 Min.
0 - 1 %	$\bar{x} = 0,0413$	$\bar{x} = 0,0254$	$\bar{x} = 0,0176$
n = 7	s = 0,0087	s = 0,0064	s = 0,0050
2 - 6 %	$\bar{x} = 0,0382$	$\bar{x} = 0,0197$	$\bar{x} = 0,0107$
n = 8	s = 0,0106	s = 0,0071	s = 0,0047

Tabelle 4: Durchschnittliche Melphalankonzentrationen im Perfusat nach 5 Min., 30 Min., 55 Min. bei verschiedenen Leckgrößen

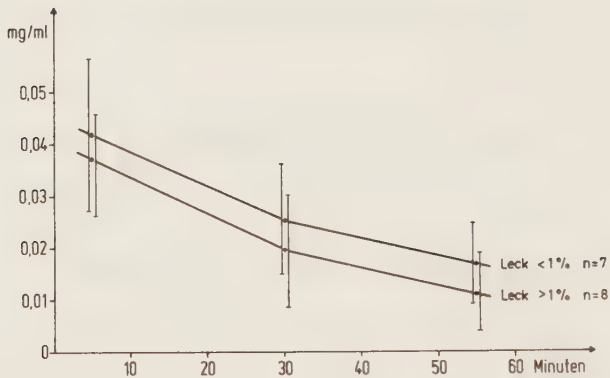


Abb. 12: Graphische Darstellung der Melphalan-
konzentrationen im Perfusat bei verschie-
denen Leckgrößen ($\leq 1\%$ und $>1\%$) in
Abhängigkeit von der Zeit

Statistisch gesehen ergaben sich, was das Diagramm verdeutlicht, trotz der geringfügig höher gelegenen Konzentrationen bei der Gruppe ohne Leck keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Reihen.

d. Schwellung des perfundierten Gewebes bei
Lösungsmittel- und Melphalaneinwirkung

Wie bereits beschrieben, war die Art der Spülflüssigkeit von entscheidender Bedeutung für das Ausmaß der postoperativen Schwellung der Extremität.

Trotz Einführung von Plasmaproteinlösung als Spülmittel zeigte sich im Anschluß an die Operation ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes Ödem der perfundierten Gliedmaßen.

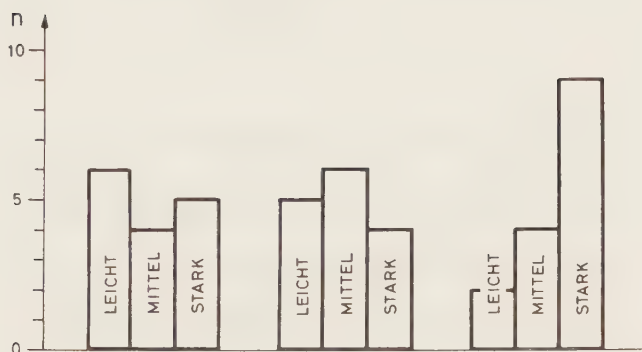
Dabei konnte nicht nur ein Einfluß der Temperatur auf die Stärke dieser Gewebeswellung festgestellt werden, sondern es zeigte sich auch beim Vergleich der 3 Versuchsreihen miteinander eine Verstärkung der Ödembildung vor allem in der 3. Reihe unter Melphalanapplikation.

Eine graduelle Abschätzung des Schwellungsausmaßes wurde am 5. postoperativen Tag vorgenommen.

Bei Einteilung in leichte, mittelstarke und starke Schwellungszustände ergibt sich folgende Übersicht:

Ausmaß der Schwellung	ohne Zusatz	mit Lösungs- mittel	mit Melfhalan	
leicht (29 %)	n = 6	n = 5	n = 2	n = 13
mittel (31 %)	n = 4	n = 6	n = 4	n = 14
stark (40 %)	n = 5	n = 4	n = 9	n = 18
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 45

Tabelle 5: postoperative Schwellung der perfundierten
Extremität bei 45 Hunden



ohne	mit	mit
Zusatz	Lösungs-	Melphalan
	mittel	

Abb. 13: Graphische Darstellung der postoperativen Schwellungszustände bei 45 Hundeperfusionen

Eine schädigende Einwirkung nur des Lösungsmittels allein auf das perfundierte Gewebe war sehr gering und kann in der Praxis wahrscheinlich vernachlässigt werden.

- e. Auswirkungen der Melphalanapplikation
auf das pH und die Blutgaswerte
(pO_2 , pCO_2 , SAT) im Perfusat

Die Kanülierung der Gefäße erforderte eine Abklemmung der Extremität vom Körperkreislauf für circa 15 bis 20 Minuten. Die dadurch bedingte hypoxische Stoffwechsellage in der Gliedmaße brachte mit zunehmender Zeitdauer durch die Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte ein kontinuierliches Absinken des pH - Wertes mit sich.

Dadurch lag der arteriell gemessene pH - Wert 5 Minuten nach Perfusionsbeginn mit einem Mittelwert von $7,15 \pm 0,12$ bei allen Perfusionen deutlich noch im sauren Bereich. Die im allgemeinen daraufhin erfolgte Gabe von Natriumhydrogencarbonat zur Pufferung bewirkte die Anhebung der pH - Werte in den physiologischen Bereich. Die Blutgasanalysen bei 30 und 55 Minuten konnten dieses bestätigen. Somit war eine differenzierte Aussage über eine etwaige Beeinflussung des pH durch Lösungsmittel- oder Melphalaneinflüsse nicht mehr möglich.

Der Vergleich der arteriellen Sauerstoffpartialdrucke innerhalb der 3 Versuchsreihen bei einem durchschnittlichen Sauerstoff - flow von 300 ml / Min. im Oxygenator ließ keine auffälligen Zusammenhänge mit der erfolgten Lösungsmittel- oder Melphalangabe erkennen. Die Werte schwankten dabei zwischen 150 und 300 mm Hg. Der sehr hoch eingestellte pO_2 sollte eine Gewebshypoxie mit Sicherheit ausschalten. Die mittlere Sauerstoffsättigung betrug 99 %.

Ebenso konnten bei der differenzierten und vergleichenden Untersuchung des Kohlendioxidpartialdruckes keine wesentlich auffälligen Abweichungen zwischen den 3 Versuchsreihen festgestellt werden. Die Werte bei den Blutgasanalysen beliefen sich im Mittel auf 34 ± 12 mm Hg.

f. Auswirkungen der Melphalanapplikation auf
das Hämoglobin in Perfusions- und Körper-
kreislauf

- Perfusionskreislauf

Bei einem durchschnittlichen Hb - Wert von
8 bis 9 g % und einem Hämatokrit von ca. 20 %
bewegte man sich im Bereich der gewünschten
Hämodilution.

Eine wesentliche Beeinflussung dieser Werte
nach Alkerangabe war nicht erkennbar.

- Körperkreislauf

Auch hier zeigten sich keine signifikanten
Unterschiede zwischen den Werten der 2. und
3. Versuchsreihe. Während den Perfusionen
traten keine bedeutenden Veränderungen der
Hb - Konzentrationen auf.

Der zwangsläufig durch die Spülung der Extremi-
tät bedingte Blutverlust konnte durch die Trans-
fusion von 400 ml Frischblut gegen Ende der Opera-
tion vollständig ausgeglichen werden.

		mittlerer Hb - Gehalt in g %				
Perfusat		vor Perf.	nach 30 Min	nach 55 Min	nach 24 h	nach 48 h
ohne	$\bar{x} =$	15,2	15,3	15,6	16,8	14,2
Melph.	$s =$	0,6	0,9	0,3	2,5	1,2
mit	$\bar{x} =$	16,2	16,8	17,1	17,9	16,1
Melph.	$s =$	0,8	0,6	1,2	2,9	1,4

Tabelle 6: Durchschnittliche Hämoglobinkonzentrationen im Körperkreislauf bei allen Temperaturen ohne (n = 15) und mit (n = 15) Melphalanzugabe in das Perfusat

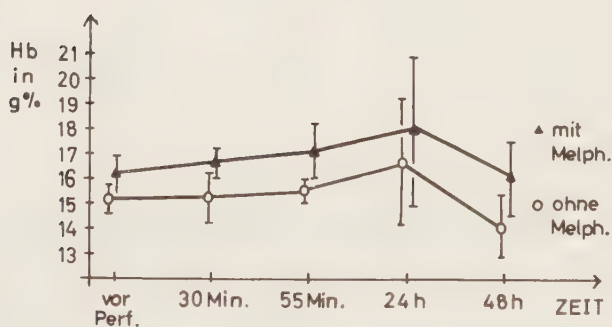


Abb. 14: Graphische Darstellung des Hb - Gehaltes im Körperkreislauf ohne und mit Melphalanzugabe in das Perfusat

g. Auswirkungen der Melphalanapplikation auf
den Kaliumspiegel im Perfusions- und
Körperkreislauf

- Perfusionskreislauf

Perfusat	mittlere Kaliumkonz. in mval / l nach		
	5 Min.	30 Min.	55 Min.

ohne	$\bar{x} =$	2,4	4,4	4,3
Melph.	$s =$	0,3	0,6	0,3
mit	$\bar{x} =$	2,2	4,9	4,5
Melph.	$s =$	0,6	0,7	1,1

Tabelle 7: Durchschnittliche Kaliumkonzentrationen
im Perfusionskreislauf bei allen Tem-
peraturen ohne (n = 15) und mit
(n = 15) Melphalanzugabe in das
Perfusat

Der niedrige 5 - Minuten - Wert war aufgrund der Hämodilution im Perfusat zu erwarten. Während der Perfusion stieg der Kaliumspiegel im extrakorporalen Kreislauf auf etwa das Doppelte des Ausgangswertes an. Als Ursache dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die mechanische Irritation der äußerst empfindlichen Hundeerythrozyten anzugeben. Unterschiede in den K^+ - Werten der 2. und 3. Versuchsreihe lagen nicht vor.

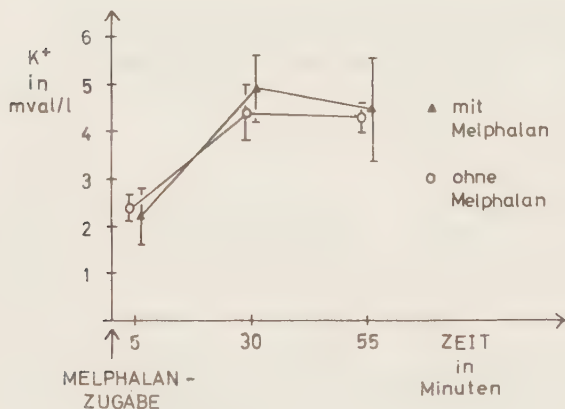


Abb. 15: Graphische Darstellung der Kaliumkonzentrationen im Perfusionskreislauf ohne und mit Melphalanzugabe

- Körperkreislauf

Der Kaliumspiegel im Körperkreislauf schwankte während der Perfusionen zwischen durchschnittlich 3,5 und 4,1 mval / l.

Dabei konnte weder eine Abhängigkeit von der Temperatur, noch von einer etwaigen Lösungsmittel- bzw. Zytostatikumeinwirkung beobachtet werden.

Postoperativ erhöhten sich die Kaliumwerte nach 24 bis 48 Stunden um circa 0,5 mval / l.

h. Einfluß des Melphalans auf die Aktivität
der Laktatdehydrogenase in Perfusions-
und Körperkreislauf

- Perfusionskreislauf

Perfusat	mittlere LDH-Aktiv. in U/l nach			
		5 Min.	30 Min.	55 Min.
ohne	$\bar{x}$ =	48	100	126
Melph.	s =	24	83	62
mit	$\bar{x}$ =	92	116	125
Melph.	s =	32	22	9

Tabelle 8: Durchschnittliche LDH - Aktivitäten
im Perfusionskreislauf bei allen
Temperaturen ohne (n = 17) und
mit (n = 17) Melphalanzugabe

Wie die Tabelle zum Ausdruck bringt, konnte ein leichter Anstieg der LDH - Aktivitäten im Perfusat während der Operation sowohl mit, als auch ohne Melphalanzugabe festgestellt werden. Signifikante Unterschiede bestanden dabei nicht.

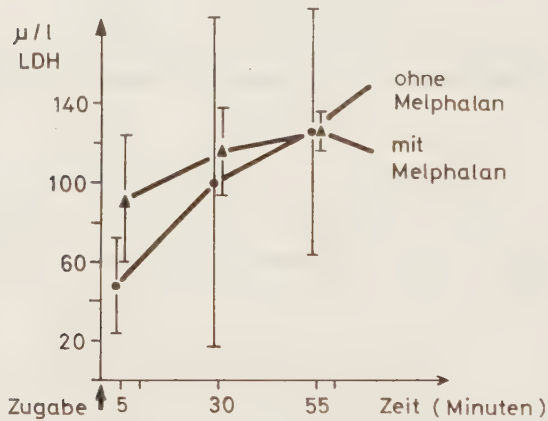


Abb. 16: Graphische Darstellung der LDH-Aktivitäten im Perfusionskreislauf ohne und mit Melphalanzugabe

Ebenfalls war keine signifikante Veränderung zwischen den LDH - Aktivitäten im Körperkreislauf in Bezug auf eine Melphalanapplikation vorhanden.

3. Statistische Methoden zur Ergebnissicherung

Die zur Anwendung gekommenen statistischen Berechnungsformeln sollen hier kurz zusammengefaßt werden.

Berechnung des arithmetischen Mittelwertes:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Berechnung der Standardabweichung des

Einzelwertes:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

Berechnung der mittleren Streuung des Mittelwertes:

$$s = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

Die statistische Absicherung zweier Mittelwerte gegeneinander erfolgte mit dem t - Test nach der Formel:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}$$

IV. DISKUSSION

Ziel der experimentellen Studie war es, so weit wie möglich die Faktoren für unerwünschte Nebenwirkungen des Verfahrens zu erkennen und zu analysieren. Die aus den Ergebnissen gewonnenen Erkenntnisse für die Perfusion am Menschen sollen zukünftig das Risiko der Behandlung für den Patienten auf ein unumgängliches Minimum reduzieren.

So konnte das bei unseren Tierexperimenten anfänglich gehäuft aufgetretene Problem der postoperativen Nachblutung durch eine Modifikation von Gefäßinzision und -naht mit anschließender Durchführung einer Sartoriusplastik gelöst werden.

Das vorzeitige Versterben von Hunden aufgrund einer Crushniere wies uns auf die enorme Wichtigkeit der gründlichen Spülung der Extremität am Ende der Perfusion hin.

Zur Verminderung der postoperativ regelmäßig aufgetretenen Schwellungen der perfundierten Extremität konnte 5 % iges Humanalbumin als Spülflüssigkeit mit Erfolg eingesetzt werden. Im Gegensatz zu der vorher angewandten Ringerlösung beobachteten wir hierbei einen deutlichen Rückgang der postoperativen Schwellungszustände. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, daß es durch den erhöhten kolloidosmotischen Druck von Plasmaproteinlösung im Vergleich zur Ringerlösung nicht zu einem derart massiven Austritt von Wasser aus dem Gefäßbett in das Interstitium kommt.

Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf die Perfusion beim Menschen erbrachte den gleichen günstigen Effekt.

Eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch die Perfusion, die sich sowohl von der Temperatur, als auch von der Anwendung des Zytostatikums abhängig zeigte, war für die mehr oder minder stark ausgeprägte postoperative Schwellung der perfundierten Extremität verantwortlich.

Verstärkte Gefäßwandläsionen aufgrund erhöhter Temperatureinwirkung und Zytostatikumapplikation sind somit anzunehmen.

Das Perfusionsminutenvolumen betrug konstant 300 ml pro Minute bei allen Versuchen und lag somit im physiologischen Bereich.

Niedrigere Perfusionsvolumina führen normalerweise nicht zu einer ausreichenden Durchwärmung der Extremität und gleichmäßigen Verteilung des Zytostatikums. Zu hoch eingestellte Werte bewirken über den zwangsläufig erhöhten Druck im arteriellen Gefäßbett eine stärkere Schädigung des durchspülten Gewebes. Bei einem Perfusionsminutenvolumen von 300 ml ist der arterielle Druck im extrakorporalen Kreislauf mit circa 100 mm Hg anzunehmen und liegt damit knapp unter dem des Körperkreislaufes. Nach Rochlin et al. (1963) ist diese Druckdifferenz für die zusätzliche Vervollständigung der Isolation der Gliedmaße vom Körperkreislauf von nicht geringer Bedeutung.

Das bei unseren Experimenten ausschließlich zur Anwendung gekommene Melphalan ist ein Zytostatikum aus der alkylierenden Reihe. Es soll als eine der Vorstufen des Melanins in pigmentproduzierende Zellen aufgenommen werden und so über den Mechanismus der Alkylierung und Vernetzung von Kernsubstanzen zytotoxisch wirken.

Nachdem Luck (1956) Erfolge bei der Heilung von transplantierten Melanomen bei Mäusen mit Melphalan verbuchen konnte, setzte Krementz dieses Zytostatikum 1957 bei den ersten Extremitätenperfusionen wirksam ein. Bis heute findet dieses Pharmakon in der regionalen hyperthermen Perfusionsbehandlung Verwendung. Neue Mittel konnten in ihrer Wirkung diese Substanz bis heute nicht übertreffen und von ihrem Platz verdrängen. Eine wesentliche Verbesserung der Ergebnisse ist durch die Kombination mit anderen Zytostatika, wie Thio-Tepa, Nitrogen-Mustard (NH_2) und Actinomycin D nicht festzustellen (Krementz et al. 1972).

Unsere Versuchsbedingungen waren darauf ausgelegt, die therapeutische Wirksamkeit von Melphalan optimal auszunützen. Über den synergistischen Effekt von Zytostatikum und Hyperthermie ist im allgemeinen Teil bereits eingegangen worden. Ergänzend bleibt noch zu sagen, daß außer zahlreichen tierexperimentellen Bestätigungen einer selektiven und gesteigerten Zerstörung von Tumorzellen Goss und Parsons (1977) einen gesteigerten hyperthermiebedingten Effekt von Melphalan auf menschliche Melanomzellen nachweisen konnten. Der von Begleiter et al. (1979) beschriebene aktive Transportmechanismus von Melphalan in die Zelle bei steigenden Temperaturen unterstreicht das günstige Zusammenspiel von Hyperthermie und angewandtem Zytostatikum.

Die während der Perfusion durchgeführten Blutgasanalysen erlaubten eine exakte Aussage über die jeweiligen Bedingungen im extrakorporalen Kreislauf. Sie ließen erkennen, daß sich unter ungünstigen Voraussetzungen im Laufe einer Perfusion sehr unphysiologische Bedingungen einstellen können.

Die Bestimmung des pH - Wertes im Perfusat ergab zu Beginn eine deutliche Azidose durch die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr bei der Kanülierung der Gefäße. Da über eigenregulative Maßnahmen diese Azidose innerhalb der Zeitdauer der Perfusion nicht vollständig kompensiert werden konnte, erfolgte eine Abpufferung mit Natriumbikarbonat im extrakorporalen Kreislauf.

Unter Berücksichtigung der von Overgaard (1977) angegebenen gesteigerten Wärmeempfindlichkeit von malignen Zellen bei erhöhter Wasserstoffionenkonzentration wählten wir einen durchschnittlichen pH - Wert von 7,3 während der Perfusion als zusätzliche tumorzellzerstörende Maßnahme.

Der Sauerstoffpartialdruck im Perfusat bewegte sich zwischen 150 mm Hg und 300 mm Hg. Dieser sehr hoch angesetzte Wert sollte mit Sicherheit eine Gewebhypoxie ausschalten. Außerdem ist mit steigendem Sauerstoffpartialdruck eine vermehrte Aufnahme von alkylierenden Substanzen in Tumorzellen gegeben (Krementz et al. 1961, Sachs et al. 1961).

Eine Beeinflussung der Blutgaswerte hinsichtlich einer Lösungsmittel- bzw. Melphalanzugabe in den Perfusionskreislauf konnte bei unseren Untersuchungen nicht festgestellt werden. Somit bleibt festzuhalten, daß die regelmäßige Anfertigung von Blutgasanalysen im Laufe einer Perfusion besonders im Hinblick auf die Durchführung dieses Verfahrens am Menschen eine sehr wichtige Rolle spielt. Nur dadurch können mit Sicherheit unphysiologische bzw. schädigende Situationen vermieden und eine optimale Gewebeschonung trotz zusätzlichen tumorzellzerstörenden Effekt gewährleistet werden.

Erst die Abtrennung der Extremität vom Körperkreislauf machte die hohe Dosierung von Melphalan mit 2 mg pro kg Körpergewicht im extrakorporalen Kreislauf möglich. Ausschlaggebend für die gefahrlose Durchführung der Operation ist eine zuverlässige Kontrolle der vollständigen Abriegelung des Perfusions- vom Körperkreislauf.

Bei unseren Experimenten kam die von Stehlin (1961) und Schraffordt Koops (1972) an-

gegebene Methode in modifizierter Art zu Anwendung. Die Bestimmung des Lecks erfolgte dabei mittels radioaktiv markiertem Chromalbumin. Dabei war es möglich, während der Perfusion in 5 - minütigen Abständen exakt das jeweilige Leck zwischen Perfusions- und Körperkreislauf über eine einfache Rechnung zu bestimmen. Somit war die Möglichkeit gegeben, bei plötzlichem Auftreten von Undichtigkeiten sofort gezielt einzuschreiten und eventuell die Operation abubrechen. Eine Überflutung des Körpers mit toxischen Zytostatikumkonzentrationen konnte demnach mit Sicherheit ausgeschaltet werden. Die Größe des Lecks betrug bei unseren Experimenten durchschnittlich 2 bis 3 %. In der letzten Versuchsreihe wurden 6 % Leck nicht überschritten. Diese Methode findet in gleicher Weise bei Perfusionen am Menschen Anwendung und hat sich bestens bewährt.

Die quantitative Bestimmung des Zytostatikums im Perfusat erfolgte nach der von Klatt (1960) beschriebenen Methode auf calorimetrischer Basis.

Dabei zeigte sich bereits 5 Minuten nach Zugabe der Gesamtmenge eine um etwa 20 % geringere Konzentration als nach den theoretischen Berechnungen hätte erwartet werden können. Die kontinuierliche Kontrolle des Lecks ließ ein Abwandern in den systemischen Kreislauf sicher ausschließen. Deshalb ist zu vermuten, daß ein Teil des Melphalans sehr schnell die Blutbahn verlässt und sich im Gewebe bzw. in den Zellen anreichert und bindet.

Eine große Frage galt auch der Abhängigkeit der Konzentrationsabnahme von verschiedenen Temperaturen (37°C , 40°C , 43°C). Wegen der erst allmählich einsetzenden Erwärmung der Extremität ließ der 5 - Minuten - Wert diesbezüglich keine brauchbare Aussage zu. Die weiteren Messungen ergaben keine besondere Temperaturabhängigkeit der Abnahme von Melphalan. Die Halbwertszeit betrug dabei etwa 30 Minuten. Im Laufe der einstündigen Perfusion fiel die Konzentration um durchschnittlich 66 % des gemessenen Ausgangswertes ab.

Somit kann davon ausgegangen werden, daß selbst bei Temperaturen um 43°C keine nennenswerte Veränderung der Pharmakokinetik von Melphalan eintritt. Die vermutete erhöhte Inaktivierung der Substanz bei erhöhten Temperaturen bestätigte sich nicht. Als Konsequenz für die Perfusion am Menschen bleibt festzuhalten, daß die Temperaturwahl ohne Rücksicht auf die Wirksamkeit des Zytostatikums getroffen werden kann. Theoretisch stünde also einer Anhebung der Perfusionstemperatur auf 42°C oder noch höher von Seiten des Melphalans nichts im Wege. Die Effektivität der Substanz wäre dabei nicht eingeschränkt.

Die Auswertung der Kalium- und Hämoglobinkonzentrationen im Perfusionskreislauf ergab keine signifikante Abhängigkeit von einer Melphalanzugabe in das Perfusat. Zum gleichen Ergebnis führte die Messung der Aktivität der Laktatdehydrogenase. Das läßt darauf schließen, daß das Zytostatikum keine zusätzliche Hämolyse bzw. andere schädigende Einflüsse in der perfundierten Gliedmaße hervorruft. Die Bestimmung der Laborwerte im Körperkreislauf des Versuchstieres zeigte ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen

in Bezug auf eine erfolgte Melphalanapplikation. Die 48 - Stunden - Werte entsprachen in der Regel wieder den Ausgangswerten vor der Operation, was die relativ geringe schädigende Einwirkung auf den Gesamtorganismus hervorhebt.

Die dabei aufgetretenen Leckgrößen (bis 6 %) sind demnach als voll tolerabel anzusehen.

Dieses bestätigt auch die vergleichende Betrachtung der Melphalanabnahme bei absolut dichten (1 %) und etwas undichten (2 bis 6 %)

Perfusionsverhältnissen. Hierbei konnten keine signifikanten Aussagen in Bezug auf die Leckgröße gemacht werden. Das bedeutet, daß die in den Körperkreislauf abwandernden Melphalanmengen bei Leckgrößen unter 6 % zu vernachlässigen sind.

Es bleibt festzuhalten, daß das Melphalan weder im Perfusions- noch im Körperkreislauf wesentliche zusätzlich schädigende Einflüsse mit sich bringt.

Mit den in unserer tierexperimentellen Studie gewonnenen Erkenntnissen ist eine Verfeinerung der Operationsmethode möglich. Dieses gilt sowohl

für die bessere Steuerung, als auch für das Erkennen und Ausschalten von Faktoren, die bisher als belastende Komplikationen bei der regionalen hyperthermen Zytostatikaperfusion auftraten. Dadurch ist ein noch wirksamerer Einsatz dieser adjuvanten Methode bei der Therapie des malignen Melanoms gegeben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die regionale hypertherme Zytostatikaperfusion ermöglicht als adjuvante Methode zur Therapie des malignen Melanoms an Extremitäten eine wesentliche Verbesserung der 5 - Jahres - Überlebensraten.

Bei diesem Verfahren wird die betroffene Gliedmaße vom Körperkreislauf abgeriegelt und über einen extrakorporalen Kreislauf perfundiert. Die kontinuierliche Kontrolle der vollständigen Isolation erlaubt eine gefahrlose Anwendung hoher Zytostatikumdosen ohne negative Auswirkungen auf den Gesamtorganismus. Die gleichzeitige Erhöhung der Temperatur im Perfusat auf circa 42 ° C ergibt einen zusätzlichen selektiven tumorzellzerstörenden Effekt im Gewebe der durchspülten Gliedmaße.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß dieses Verfahren unter Umständen erhebliche Komplikationen und Nebenwirkungen mit sich bringen kann. Im Vorder-

grund standen dabei starke Schwellungszustände, Gewebnekrosen und auch häufig länger anhaltende Nervenschädigungen der perfundierten Extremitäten nach der Operation.

Die von uns durchgeführte tierexperimentelle Studie sollte nun Aufschlüsse über die schädigenden Faktoren bringen und Möglichkeiten einer Verbesserung dieser Methode mit Reduzierung der zum Teil schweren Nebenwirkungen aufzeigen. Außerdem wollten wir anhand der Ergebnisse überprüfen, ob eine weitere Steigerung der Effektivität durch den idealen Einsatz von Hyperthermie und Zytostatikum noch möglich ist.

Die isolierte Extremitätenperfusion wurde bei 66 Hunden durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß durch eine geeignete Operationstechnik die verfahrensunspezifischen Komplikationen, wie Nachblutungen und Thrombosen der kanülierten Gefäße, weitgehend ausgeschaltet werden können. Die Spülung der Extremität am Ende der Perfusion mit Plasmaproteinlösung brachte eine deutliche Verringerung der postoperativen

Schwellungszustände mit sich. Das Ausmaß der Schwellungen war noch von der Erhöhung der Temperatur und der Anwendung des Zytostatikums abhängig. Durch in regelmäßigen Abständen durchgeführte Blutgasanalysen und Laboruntersuchungen der Perfusionslösung lassen sich dafür mitverantwortliche unphysiologische Bedingungen sofort erkennen und rechtzeitig korrigieren.

Von großem Interesse war auch die Bestimmung der Zytostatikumkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten im Perfusat.

Dabei stellte sich heraus, daß das zugegebene Melphalan rasch aus dem Kreislauf in das Gewebe übertritt. Die Halbwertszeit betrug etwa 30 Minuten. Die Konzentration nach 55 Minuten belief sich noch auf circa $1/3$ der des Ausgangswertes.

Ferner konnten wir keine wesentliche Abhängigkeit des Abbaus von Melphalan von der jeweiligen Temperatur und der herrschenden Leckgröße erkennen. Deshalb ist selbst bei Temperaturen bis 43°C keine vorzeitige Inaktivierung von Melphalan an seinen Wirkorten zu befürchten.

Ebenso zeigte sich weder im Perfusions- noch im Körperkreislauf eine gravierende Beeinflussung von Labor- und Blutgaswerten seitens des Zytostatikums. Eine zusätzliche Schädigung von gesundem Gewebe durch das Melphalan scheint demnach nicht stattzufinden.

Abschließend bleibt festzustellen, daß die Erkenntnisse aus unserer tierexperimentellen Untersuchung dazu beitragen konnten, zukünftig die belastenden Komplikationen und Nebenwirkungen dieses Verfahrens auf ein unumgängliches Minimum zu reduzieren und für den Patienten die Methode der regionalen hyperthermen Zytostatikaperfusion als adjuvante Maßnahme bei der Therapie des malignen Melanoms noch effektiver zu gestalten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Baba, T.; Aoki, K.; Kidera, Y.; Kimura, M.;
Kanematsu, T.; Kimura, N.T.:
Temporary interruption of regional blood
flow combined with local hyperthermia
for cancer chemotherapy.
Cancer Res. 36, 2146 (1976)
- 2 Baba, T.; Kimura, N.T.; Kanematsu, T.; Aoki, K.;
Kidera, Y.; Kamura, T.; Taniguchi, S.;
Kimura, M.: A new approach to thermo-
chemotherapy of cancer and metastases.
Gann 20, 227 (1977)
- 3 Bauer, K.H.: Das Krebsproblem.
Berlin - Göttingen - Heidelberg,
Springer (1948, 1963)
- 4 Begleiter, A.; Lam, H. Y. P.; Grover, J.;
Froese, E.; Goldenberg, G.J.:
Evidence of active transport of
melphalan by two amino acid carriers
in L 51784 lymphoblasts in vitro.
Cancer Res. 39, 353 (1979)

- 5 Ben - Hur, E.; Elkind, M.M.; Riklis, E.:
The combined effects of hyperthermia
and radiation in cultured mammalian cells.
in: Cancer Therapy by Hyperthermia
and Radiation, Baltimore - München,
Urban & Schwarzenberg, 29 (1978)
- 6 Burnett, H. F.; Marby, C. D.; Westbrook, K. C.;
Campbell, G. S.: Isolation regional
perfusion: an experimental study.
Surgical Forum 123 (1976)
- 7 Cavaliere, R.; Ciocatto, E. C.; Giovanella, B. C.;
Heidelberger, C.; Johnson, R. O.;
Margottini, M.; Mondovi, B.; Moricca, G.;
Rossi - Fanelli, A.: Selective heat
sensitivity of cancer cells.
Cancer (Philad.) 20, 1351 (1967)
- 8 Clark jr., W. H.; From, L.; Barnardino, E. A.;
Mihm, M. C.: The histogenesis and
biologic behaviour of primary human
malignant melanomas of the skin.
Cancer Res. 29, 705 (1969)
- 9 Creech jr., O.; Krementz, E. T.: Techniques
of regional perfusion.
Surgery 60, 938 (1966)

- 10 Crile, G.: Selective destruction of cancers after exposure to heat.
Ann. Surg. 156, 404 (1962)
- 11 Dickson, J. A.; Oswald, B. E.: The sensitivity of a malignant cell line to hyperthermia (42°C) at low intracellular pH.
Br. J. Cancer 34, 262 (1976)
- 12 Dickson, J. A.; Suzangar, M.: A predictive in vitro assay for the sensitivity of human solid tumors to hyperthermia (42°C) and its value in patient management.
Clinical Oncologie 2, 141 (1976)
- 13 Dickson, J. A.: The effects of hyperthermia in animal tumor systems.
in: Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, Berlin - Heidelberg - New York, Springer 43 (1977)
- 14 Dietzel, F.: Thermo - Radio - Therapie.
München - Wien - Baltimore,
Urban & Schwarzenberg (1978)
- 15 Eder, M.; Gedigk, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie.
Berlin - Heidelberg - New York,
Springer (1977)

- 16 Giovanella, B. C.; Morgan, A. C.; Stehlin, J. S.;
Williams, L. J.: Selective lethal
effect of supranormal temperatures on
mouse sarcoma cells.
Cancer Res. 33, 2568 (1973)
- 17 Goss, P.; Parsons, P. G.: The effect of hyper-
thermia an melphalan on survival of
human fibroblast strains and melanoma
all lines.
Cancer Res. 37, (1977)
- 18 Habermann, E.; Löffler, H.: Spezielle Pharma-
kologie und Arzneitherapie.
Berlin - Heidelberg - New York,
Springer (1977)
- 19 Hahn, G. M.: Interaktionen of drugs and hyper-
thermia in vitro and in vivo.
in: Cancer Therapy by Hyperthermia
and Radiation, Baltimore - München,
Urban & Schwarzenberg 72 (1978)
- 20 Harper, H. A.; Löffler, G.; Petrides, P. E.;
Weiss, L.: Physiologische Chemie.
Berlin - Heidelberg - New York,
Springer (1975)
- 21 Hermanek, P.: Klinische Pathologie der
Haut- und Weichteiltumoren.
Chirurg 45, 293 (1974)

- 22 Klatt, O.; Griffin, A. C.; Stehlin, J. S.:
Method for determination of phenylalanine
mustard and related alkylating agents in
blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 629 (1960)
- 23 Krementz, E. T.; Knudson, L.: The effect of
increased oxygen tension on the
tumoricidal effect of nitrogen mustard.
Surgery 50, 266 (1961)
- 24 Krementz, E. T.; Ryan, R. F.: Chemotherapy
of melanoma of the extremities by
perfusion: fourteen years clinical
experience.
Ann. Surg. 175, 900 (1972)
- 25 Kuschinsky, G.; Lüllmann, H.: Kurzes Lehrbuch
der Pharmakologie und Toxikologie.
Stuttgart, Thieme (1976)
- 26 Lejeune, F. J.; Mathieu, M.; Kenis, Y.:
Hyperthermic isolation - perfusion with
melphalan. A preliminary appraisal of
local and general effects in malignant
melanoma.
Tumori 63, 289 (1977)
- 27 Linder, F.: Der Stand der chirurgischen Therapie
in der modernen Krebsbehandlung.
Berlin - Heidelberg - New York,
Springer (1978)

- 28 Luck, J. M.: Action of p - Di (2 - chloroethyl)-
amino - L - phenylalanine on harding -
passey mouse melanoma.
Science 123, 984 (1956)
- 29 Osieka, R.; Schmidt, C. G.: Cis - Diamino -
Dichloro - Platin (II).
Klin. Wochenschrift 57, 1249 (1979)
- 30 Overgaard, J.: Effect of hyperthermia on
malignant cells in vivo.
Cancer 39, 2637 (1977)
- 31 Reed, W. A.; Hopkins, L.: Tissue tolerance
to hyperthermic blood perfusion of
dog hind limb.
Amer. J. Physiol. 203, 1062 (1962)
- 32 Rochlin, D. B.; Smart, C. R.; Shiner, J.:
The control of systemic admixture
during isolation perfusion.
Surg. Gynec. Obstet. 115, 71 (1963)
- 33 Sachs, D.; Shiner, J.; Bauer, R. D.; Rochlin, D. B.:
Isolation perfusion and oxygen saturation.
Surg. Forum 129 (1961)
- 34 Schettler, G.: Innere Medizin.
Band I und II
Stuttgart, Thieme (1976)

- 35 Schraffordt Koops, H.: Prevention of neural and muscular lesions during hyperthermic regional perfusion.
Surg. Gynec. Obstet. 135, 401 (1972)
- 36 Schraffordt Koops, H.; Oldhoff, J.; van der Ploeg, E.; Vermey, A.; Eibergen, R.: Isolated regional perfusion in the treatment of malignant melanomas of the extremities.
Arch. chir. neerl. 237 (1975)
- 37 Stehlin, J. S.; Clark, R. L.; Dewey, W. C.: Continuous monitoring of leakage during regional perfusion.
Arch. Surg. 83, 943 (1961)
- 38 Stehlin, J. S.; Giovanella, B. C.; de Ipolyi, P. D.; Muenz, L. R.; Anderson, R. F.: Results of hyperthermic perfusion for melanoma of the extremities.
Surg. Gynec. Obstet. 140, 339 (1975)
- 39 Strom, R.; Crifo, C.; Rossi - Fanelli, A.; Mondovi, B.: Biochemical aspects of heat sensitivity of tumor cells. in: Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, Berlin - Heidelberg - New York, Springer 7 (1977)
- 40 Suzuki, K.: Application of heat to cancer chemotherapy - experimental studies -.
Nagoya J. med. Sci. 30, 1 (1967)

- 41 Tattersall, M. H.; Jarman, M.; Newlands, E. S.; Holyhead, L.; Milstead, R. A.; Weinberg, A.: Pharmacokinetics of melphalan following oral or intravenous administration in patients with malignant disease.
Europ. J. Cancer 14, 507 (1978)
- 42 Tattersall, M. H.; Jarman, M.; Newlands, E. S.; Holyhead, L.; Milstead, R. A.; Weinberg, A.: Studies with labelled melphalan in patients with malignant disease.
Cancer Treat. Rev. Suppl. 6, 52 (1979)
- 43 Tonak, J.; Hermanek, P.; Groitl, H.: Malignant melanoma: microstages and individualized therapy.
Aust. N. Z. J. Surg. 48, 282 (1978)
- 44 Westra, A.; Dewey, W. C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro.
Int. J. Radiat. Biol. 19, 467 (1971)
- 45 Wieberdink, J.: Physiological considerations regarding isolation perfusion of the extremities.
E.O.R.T.C. - Symposium on Malignant Melanoma, Amsterdam, 16. 10. 1979

Herrn Prof. Dr. med. F. P. Gall,

danke ich für die freundliche Bereitstellung des
Arbeitsplatzes.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. J. Tonak,

danke ich vielmals für die Überlassung des Themas,
sowie die Unterstützung bei der Durchführung der
Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. P. O. Schwille,

danke ich für seine freundliche Beratung und
Hilfe.

Lebenslauf

Name: Jonas Franz Xaver Oskar Göhl

geboren: 24. Juli 1955 in Waldsassen,

Kreis Tirschenreuth

Wohnort: Mitterteicher Str. 28, 8595 Waldsassen

Vater: Josef F. Göhl

Beruf: Leitender Angestellter

Mutter: Annemarie Göhl, geb. Bezold

Schulen: Volksschule Waldsassen

Stiftland - Gymnasium Tirschenreuth

Abitur am 20. Juni 1975

Universität: Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen, Medizin Wintersemester 1975/76

Ärztliche Vorprüfung am 31. August 1977

Erster Abschnitt der ärztlichen

Prüfung am 31. August 1978

Zweiter Abschnitt der ärztlichen

Prüfung am 22. August 1980

Ärztliche Prüfung am 14. Oktober 1981

Approbation am 26. Oktober 1981

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197